

Identifikasi *Channel Catfish Virus* (CCV) - Bagian 2: Metode *Indirect Fluorescent Antibody* (IFA)



© BSN 2013

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun serta dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN
Gd. Manggala Wanabakti
Blok IV, Lt. 3,4,7,10.
Telp. +6221-5747043
Fax. +6221-5747045
Email: dokinfo@bsn.go.id
www.bsn.go.id

Diterbitkan di Jakarta

Daftar isi

Daftar isi.....	i
Prakata	ii
1 Ruang lingkup.....	1
2 Istilah dan definisi	1
3 Prinsip.....	2
4 Peralatan	2
5 Bahan	2
6 Prosedur	2
7 Interpretasi hasil	3
8 Pelaporan	3
Lampiran A (normatif) Pembuatan media dan pereaksi	4
Bibliografi	6



Prakata

Dalam rangka keberlanjutan usaha budidaya, meningkatkan produktivitas dan memberikan jaminan mutu komoditas perikanan serta memberikan hasil uji yang akurat bagi setiap pengujian di Laboratorium acuan dan uji, maka perlu disusun suatu Standar Nasional Indonesia (SNI) tentang Identifikasi *Channel Catfish Virus* (CCV) – Bagian 2: Metode *Indirect Fluorescent Antibody* (IFA).

Standar ini disusun oleh Subpanitia Teknis (SPT) 65-05-S2 Perikanan Budidaya dan telah dibahas melalui rapat teknis dan terakhir disepakati dalam rapat konsensus pada tanggal 9 November 2011 di Riau, yang dihadiri oleh unsur pemerintah, produsen, konsumen, lembaga penelitian, perguruan tinggi, serta instansi terkait sebagai upaya untuk meningkatkan jaminan mutu dan keakuratan hasil uji dengan memperhatikan:

- 1 Peraturan Menteri Kelautan dan Perikanan No. PER.19/MEN/2010 tentang Pengendalian Sistem Jaminan Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan.
- 2 Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Kep.01/Men/2002 tentang Sistem Manajemen Mutu Terpadu Hasil Perikanan.
- 3 Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Kep.06/Men/2002 tentang Persyaratan dan Tata Cara Pemeriksaan Mutu Hasil Perikanan yang Masuk ke Wilayah Republik Indonesia.
- 4 Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Kep.21/Men/2004 tentang Sistem Pengawasan dan Pengendalian Mutu Hasil Perikanan untuk Pasar Uni Eropa.
- 5 Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI Nomor: KEP.03/MEN/2010 tentang Daftar Hama Penyakit Ikan Karantina.

Standar ini telah melalui proses jajak pendapat pada tanggal 9 April 2012 sampai 8 Juni 2012 dengan hasil akhir RASNI.

Identifikasi *Channel Catfish Virus* (CCV) – Bagian 2: Metode *Indirect Fluorescent Antibody* (IFA)

1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan identifikasi *Channel Catfish Virus* (CCV) dengan menggunakan metode *Indirect Fluorescent Antibody* (IFA).

2 Istilah dan definisi

2.1

aliquot

tiap bagian yang mempunyai hubungan kuantitatif terhadap keseluruhan atau terhadap bagian lain dari keseluruhan yang sama, contoh plasma atau serum diambil untuk menentukan komposisi kuantitatif keseluruhan itu

2.2

antibodi

molekul *immunoglobulin* yang mempunyai suatu rantai asam amino spesifik, hanya berinteraksi dengan antigen yang menginduksi sintesis molekul ini di dalam sel dari sel *limfoid* (khususnya sel plasma), atau dengan antigen yang erat hubungannya dengan antigen tersebut. Antibodi digolongkan menurut cara kerjanya, seperti *agglutinin*, *bakteriolisin*, *hemolisin*, *opsonin*, *presipitin*, dll

2.3

carrier (pembawa)

inang (*host*) yang tidak menunjukkan gejala klinis (biasanya setelah sembuh dari infeksi awal). Proses infeksi terus berjalan secara ringan (*latent*) dalam waktu yang lama (*persistent*). Bila terjadi stress, proses infeksi dapat meningkat (infeksi aktif) sampai menunjukkan gejala klinis

2.4

cytopathic effect (CPE)

efek yang ditimbulkan berupa perubahan patologis dalam kultur sel

2.5

fluorochrome

pewarna *fluorescen* yang membentuk dasar pewarna pada *secondary antibody*

2.6

fluorescein isothiocyanate (FITC)

zat warna yang berpendar (*fluorescent*) bila terpapar sinar ultraviolet, menampilkan warna hijau

2.7

homogenat

cairan yang berasal dari hasil gerusan organ

2.8

konjugat

antibodi poliklonal yang dikonjugasikan dengan *Fluorescein Isothiocyanate* (FITC)

2.9

numerical aperture (na)

ukuran lebarnya celah yang dilewati cahaya

3 Prinsip

Mengisolasi dan memurnikan virus ikan yang digunakan pada kultur kemudian diidentifikasi dengan metoda uji IFA.

4 Peralatan

- a) *autoclave*;
- b) inkubator;
- c) mikroskop - *flourecent*;
- d) mikropipet;
- e) *refrigerator*;
- f) *wellplate*.

5 Bahan

- a) aseton 30 % (suhu - 20 °C);
- b) alkohol 70 % (suhu - 20 °C);
- c) antibodi poliklonal konjugat;
- d) larutan FITC konjugat (*Fluorescein Isothiocyanate*);
- e) *glycerol saline* pH 8,5;
- f) PBS (pH 7,2);
- g) sel *monolayer Channel Catfish Ovary* (CCO) *tween* 80.

6 Prosedur

6.1 Metode screening

- a) siapkan sel *monolayer* didalam 2 cm² sumuran (*well*) dari 24 - *well plate* plastik kultur sel atau pada *cover slip* berisi sel CCO untuk menghasilkan 80% pertumbuhan (*confluency*) dalam 12 jam – 24 jam untuk setiap isolat virus yang akan diidentifikasi. Empat sumuran (*well*) digunakan untuk pengenceran 2 kali dari virus yang akan diuji dengan serum positif dan serum kontrol negatif (non relevan antibodi yang memiliki struktur mirip dengan antibodi yang diuji) dan 2 sumuran akan digunakan untuk kontrol virus dengan serum positif dan kontrol serum negatif.
- b) bila sel *monolayer* telah siap untuk diinfeksi, inokulasikan suspensi virus dengan sebanyak 100 µl dari pengenceran perseratus dan perseribu langsung ke dalam sumuran kultur sel.
- c) encerkan suspensi kontrol virus CCV dengan cara yang sama untuk memperoleh *titer* virus 5 000 *Plaque Forming Unit* (PFU) - 10 000 *Plaque Forming Unit* (PFU) per ml di dalam medium kultur sel dan inokulasikan dua sumuran sebanyak 100 µl setiap sumur.
- d) inkubasikan pada suhu 25 °C selama 18 jam.
- e) buang media kultur sel, dan bilas satu kali dengan 0,01 M *Phospate Buffered Saline* (PBS) pH 7,5, kemudian awetkan dalam 100% methanol.
- f) untuk *cover slip*, bilas secara cepat sebanyak tiga kali menggunakan aseton dingin (aseton dingin disimpan pada -20 °C). Untuk sumuran (*well*) plastik bilas dengan campuran dari aseton 30% dan alkohol 70 % (V/V) yang juga disimpan pada -20 °C.

- g) fiksasi selama 10 menit (0,5 ml larutan fiksatif untuk setiap 2 cm² sel *monolayer*).
- h) keringanginkan sel *monolayer* lebih kurang 30 menit.
- i) siapkan larutan antibodi *polyclonal* yang telah dimurnikan atau serum untuk CCV didalam 0,01 M PBS pH 7,2 berisi 0,05 % *Tween* 80 (PBST) pada pengenceran yang tepat (yang telah disiapkan sebelumnya; tidak ada CCV spesifik antiserum yang tersedia di pasaran) atau gunakan pengenceran 1/2 kali dari supernatan (bagian cair) dari sel kultur bila menggunakan kultur sel tak terkonsentrat dari MAb.
- j) *rehidras*i sel *monolayer* secara bertingkat (4 tahap) dengan menggunakan larutan PBST dan buang habis *bufer* setelah pembilasan terakhir.
- k) tambahkan larutan antibodi ke sel *monolayer* selama 1 jam pada suhu 37 °C pada tempat /wadah yang lembab. Volume larutan antibodi yang digunakan 0,25 ml/2 cm² sumuran (*well*).
- l) bilas 4 kali dengan PBST seperti diatas.
- m) tambahkan antibodi yang telah dikonjugasi dengan FITC (*Fluorescein Isothiocyanate*) ke sel *monolayer* selama 1 jam pada 37°C.
- n) bilas 4 kali dengan PBST seperti diatas.
- o) amati segera sel-sel yang telah diberi perlakuan didalam wadah plastik. Sementara sel yang ditempatkan pada *cover slip* ditetesi *glycerol saline* pH 8,5 sebelum dilakukan pengamatan mikroskop.
- p) periksa dibawah sinar UV dengan menggunakan mikroskop *fluorescent* dengan perbesaran 200 kali – 400 kali lensa objektif dengan *na* (*numerical aperture*) tinggi. Kontrol positif dan negatif harus memberikan hasil dalam pengamatan ini.

6.2 Metode diagnostik

- a) bedah ikan secara menyeluruh.
- b) buat *imprint* ginjal di atas *slide* yang bersih atau di dasar sumuran *plate* plastik kultur sel.
- c) simpan bagian ginjal bersama dengan bagian tubuh lain untuk isolasi virus jika diperlukan untuk uji berikutnya.
- d) *imprint* dikeringanginkan selama 20 menit.
- e) fiksasi dengan aseton atau alkohol/aseton dan keringkan seperti ditunjukkan pada point 7.1 langkah f) sampai g).
- f) *rehidras*i persiapan di atas (lihat metode *screening* point 7.1 langkah l) dan blok dengan 5 % susu skim atau 1 % *Bovine Serum Albumin*, di dalam PBST selama 30 menit suhu 37 °C.
- g) bilas sebanyak 4 kali dengan PBST.
- h) perlakukan *imprint* dengan larutan antibodi anti-CCV dan bilas seperti ditunjukkan pada metode *screening* point 7.1.
- i) blok dan bilas seperti sebelumnya yaitu langkah f) dan g).
- j) reaksi dapat teramati dengan *FITC-conjugated antibody* spesifik yang sesuai, bilas dan amati seperti ditunjukkan pada langkah o dan p).

CATATAN Jika hasil tes adalah negatif, organ contoh disimpan dalam 4 °C untuk isolasi virus dalam kultur sel.

7 Interpretasi hasil

Contoh adalah CCV positif jika berpendar hijau saat pengamatan.

8 Pelaporan

Contoh dinyatakan menderita CCV jika terjadi *cytopathic effect* (CPE) pada kultur *Chanel Catfish Ovary* (CCO) dan positif pada salah satu pemeriksaan identifikasi.

Lampiran A
(normatif)
Pembuatan media dan pereaksi

A.1 10 x Phospat Buffer Saline (PBS)

Bahan:

NaCl	80 g
KCl	2 g
Na ₂ HPO ₄	14,4 g
KH ₂ PO ₄	2,4 g
Akuades	800 ml

Cara membuat:

- larutkan semua bahan diatas kemudian sesuaikan ph.
- aduk hingga semua bahan larut.
- tambahkan akuades sampai 1000 ml.

A.2 Media kultur Chanel Catfish Ovary (CCO)

Cara membuat:

- campurkan satu *sachet* bubuk MEM dengan 800 ml akuades bebas *pyrogen*.
- tambahkan 3,6 g HCO₃.
- aduk hingga semua bahan larut.
- tambahkan akuades bebas *pyrogen* sampai 1 000 ml.
- sterilkan dengan cara filtrasi.

A.3 Buffer 10 x tris (0.5 M)

Cara membuat:

- campur *tris* base (60,57 g/l), *sodium chloride* (89 g – 90 g), dan *hydrochloric acid* (30 ml).
- sesuaikan pH 7,8.
- encerkan 10 x saat akan digunakan.

A.4 PBST (Phoaspat Buffered Saline-Tween)

Cara membuat:

Campur 0.01 M PBS pH 7.2 dengan 0.05 % *tween* 80.

A.5 Buffer proteinase K

Cara membuat:

- campurkan 50 mM KCl, 15 mM *tris*-HCl pH 8.3 dan 0,5 % *nonidet* P-40.
- tambahkan 0,5 mg *proteinase* K untuk setiap ml campuran di atas.

A.6 Susu Skim 5 %

5 gram susu skim bubuk larutkan dalam 100 ml PBS.

A.7 Glycerol

Bahan :

Glycerol	650 ml
1 M MgSO ₄	100 ml
1 M Tris (pH 8)	25 ml
H ₂ O sampai	1 l

Cara membuat :

Campur rata dan *autoclave* selama 15 menit pada 121 °C.

Bibliografi

Australian Government, 2004. *Disease of Finfish, Viral diseases- Channel catfish virus diseases*. Departement of Agriculture, Fisheries and Forestry (www.disease-watch.com)

Metode standar pemeriksaan Hama dan Penyakit Ikan Karantina golongan virus.

OIE, 2006. *Manual of Diagnostic Test for Aquatic Animal*, Office des International des Epizooties (OIE) chapter 2.6.1.

